

Estructura cristalina de hidroxiapatita presente en el fémur de rata wistar con diabetes inducida

Crystalline structure of hydroxyapatite presents in the femur of wistar rat with induced diabetes

G. Herrera-Pérez ^{a,*}, V. I. Landeros-Velazquez ^a, E. Rodríguez-Miranda ^b, R. Vargas-Bernal ^a

^a Departamento de Ingeniería en Materiales, Tecnológico Nacional de México / ITS de Irapuato, 36821, Irapuato, Guanajuato, México.

^b Departamento de Medicina y Nutrición, División de Ciencias de la Salud, Universidad de Guanajuato Campus León, 37320, León, Guanajuato, México.

Resumen

El hueso es un tejido que se clasifica como un material compuesto. En los seres vivos, los huesos además de tener una función estructural también son un sitio de almacenamiento de minerales. La estructura básica del hueso son unidades de procolágeno y cristales de hidroxiapatita, esta última con sustituciones de iones tanto atómicos (Na^+ , K^+ , Mg^{+2} , Ca^{+2} , F^- , Cl^-) como moleculares (CO_3^{-2}). Los sustituyentes iónicos varían de acuerdo con el entorno del hueso y la sustitución puede ser afectada por algunas enfermedades como la diabetes. En este trabajo, se reportan los patrones de difracción de rayos-x de fémures extraídos de ratas wistar con diabetes inducida. En estos difractogramas se observaron diferencias en la señal principal (211) por lo que se utilizó el refinamiento rietveld para identificar las fases cristalinas para su estimación cuantitativa. Los resultados muestran el efecto de la diabetes inducida en la calidad de la hidroxiapatita.

Palabras Clave: Hidroxiapatita, Hidroxiapatita-Carbonatada, Difracción de Rayos-X, Refinamiento Rietveld.

Abstract

Bone is a tissue that is classified as a composite material. In living beings, bones, in addition to having a structural function, are also a storage site for minerals. The basic structure of bone is procollagen units and hydroxyapatite crystals, the latter with both atomic (Na^+ , K^+ , Mg^{+2} , Ca^{+2} , F^- , Cl^-) and molecular (CO_3^{-2}) ion substitutions. The ionic substituents vary according to the environment of the bone and some diseases such as diabetes can affect the substitution. In this work, the x-ray diffraction patterns of femurs extracted from wistar rats with induced diabetes are reported. In these diffractograms, differences were observed in the main signal (211), so the rietveld refinement was used to identify the crystalline phases for their quantitative estimation. The results show the effect of induced diabetes on the quality of hydroxyapatite.

Keywords: Hydroxyapatite, Hydroxyapatite-Carbonated, X-Ray Diffraction, Rietveld Refinement.

1. Introducción

1.1. Tejido óseo

El hueso es un material compuesto, cuyos dos principales componentes son microfibrillas discontinuas de colágeno y cristales de bioapatita (Fleet, 2017; Pasteris, 2008), en la matriz de la red de colágeno es donde la nucleación y crecimiento de la apatita del tejido óseo ocurre. Las apatitas se caracterizan por su capacidad de sustitución elemental, lo que indica que los cristales de apatita pueden variar de sustituyentes iónicos en función del radio iónico, el estado de difusión iónico y del

entorno fisiológico en el cual ocurre la osteogénesis. Es posible encontrar iones de Na, K, Mg, Ca, F, Cl y hasta de C siempre que se cumpla la condición de equilibrio de carga iónica (Ardanova, 2010; Pasteris, 2008). Sin embargo, en la estructura ósea predomina la sustitución aniónica del grupo hidroxilo (OH^-) en la apatita con estructura hexagonal, véase Figura 1.

1.2. Génesis de tejido óseo

El tejido óseo de los mamíferos se forma a partir un proceso denominado como osteogénesis que está constituido por cuatro etapas: la osificación, la calcificación, la formación de

*Autor para la correspondencia: gabriel.hp@irapuato.tecnm.mx

Correo electrónico: gabriel.hp@irapuato.tecnm.mx (Gabriel Herrera Pérez), lis17111671@irapuato.tecnm.mx (Victor Ivan Landeros Velazquez), erodriguez@ugto.mx (Esmeralda Rodríguez Miranda) y rafael.vb@irapuato.tecnm.mx (Rafael Vargas Bernal).

trabéculas y el desarrollo del periostio. En la osificación hay aparición de marcadores y células osteogénicas inician el desarrollo de tejido conectivo en un punto específico de la estructura ósea, es denominado como centro de osificación, es donde se presenta acumulación de fibrillas de colágeno tipo 1, véase Figura 2, los átomos de oxígeno son esquematizados de color rojo, los átomos de nitrógeno de color magenta, los átomos de carbono de azul y los átomos de hidrógeno color rosa.

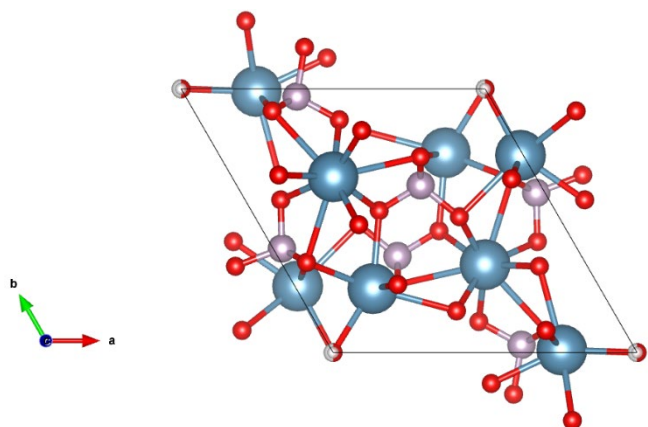


Figura 1: Estructura hexagonal de la hidroxiapatita, $a=b=9.41 \text{ \AA}$ y $c=6.89 \text{ \AA}$. Modelado y editado en VESTA 2022.

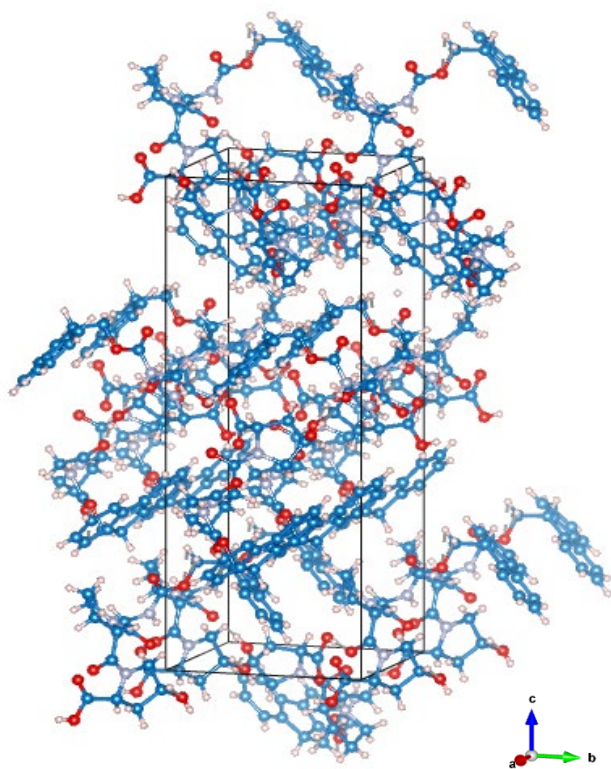


Figura 2: Estructura de fibra de Colágeno Tipo 1. Modelado y editado en VESTA 2022.

Las especies minerales entran a escena durante la calcificación dicho proceso se desarrolla a partir de los procesos metabólicos de los osteoblastos, donde sales presentes en el organismo como: fosfato de calcio ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), hidróxido de calcio ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) y carbonato de calcio (CaCO_3), fungen como precursores de la hidroxiapatita (Setiawati, 2008; Tortora, 2004).

A nivel estructural, el tejido óseo del fémur se encuentra constituido en su superficie por el endostio que es una fina membrana que limita la cavidad medular, la cual contiene una sola capa de células formadoras de hueso y una pequeña cantidad de tejido conectivo. Esta capa se encuentra acoplada a una abundante matriz extracelular que rodea a células muy separadas de otras, con formaciones consecutivas minerales de hidroxiapatita de 67 nm, con crecimiento en los ejes c , entre cada fibra de colágeno (Gshalaev, 2012), ver Figura 3. El hueso *in vivo*, está constituido de un 25 % de agua, un 25% de fibras de colágeno y un 50 % de sales minerales cristalizadas, la sal mineral más abundante es el $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, la cual se combina con otra sal mineral el $\text{Ca}(\text{OH})_2$, para formar cristales de hidroxiapatita. A medida que éstos se van formando, se combinan también con otras sales minerales, como el CaCO_3 y con iones de magnesio, flúor, potasio y sulfato (Li, 2014; Tortora, 2004).

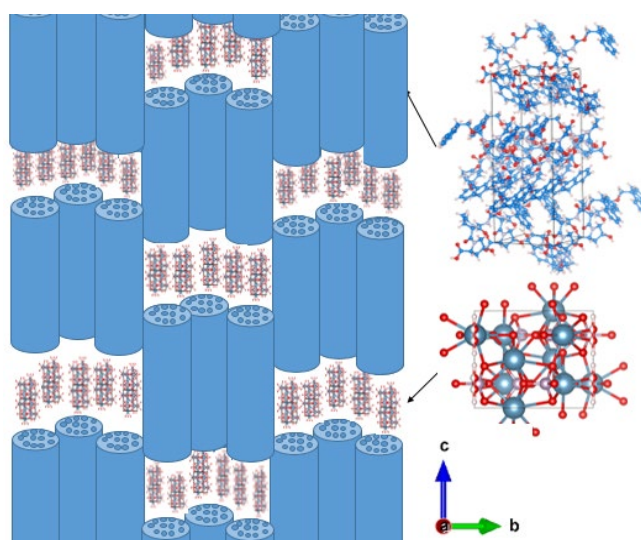


Figura 3: Representación de la estructura del hueso (fémur), localización de la OH-Ap (bioapatita). Modelado y editado en VESTA 2022.

En la literatura científica se encuentra reportado que la apatita ósea y sus análogos durante la precipitación a temperatura corporal, la mayor parte del carbonato (CO_3^{2-}) se aloja en el sitio del fosfato (PO_4^{3-}). Sin embargo, también se observa una correlación inversa entre las concentraciones de CO_3^{2-} y OH^- en las bioapatitas, debido a que la sustitución de x moles de fosfato por carbonato equilibra a través de y moles de vacantes tanto en el sitio del calcio como del hidroxilo (Pasteris, 2008; Yoder, 2016). La sustitución iónica de las apatitas óseas, funge como un depósito de iones de calcio y ortofosfato, los cuales son necesarios para la amplia variedad de funciones metabólicas, que ofrecen o consumen dichos iones, a través de un llamado proceso de "remodelación" debido a una continua reabsorción de formación de nanopartículas de apatita por los osteoclastos y osteoblastos respectivamente.

El contenido iónico de la hidroxiapatita (OH-Ap) en huesos de ratas wistar, puede variar en función de las condiciones fisiológicas. Esto se debe a la tendencia a la sustitución iónica en hidroxiapatita amorfa o cristalina, donde hay un intercambio muy activo en la primera capa de hidratación, así como la interacción de los iones Ca^{2+} como ácido de Lewis en dicha región. Esta característica le aporta una fuerte tendencia a interactuar con moléculas de H_2O y CO_3^{2-} (Gshalaev,

2012). Se ha demostrado una relación entre la deficiencia de calcio y con contenido de iones de CO_3^{2-} en la red cristalina, donde el tamaño de cristal y el contenido de iones CO_3^{2-} del hueso aumentan en función de la edad de las ratas. La descalcificación de OH-Ap, ocurre acorde a la ecuación 1, donde y es el decremento y x el incremento de fracción estequiométrica. La literatura también reporta un aumento en la relación iónica Ca/P, de 1.43 a 1.70, en función de la descalcificación. En la literatura científica se encuentra reportada este tipo de interacción iónica desde 1987 por R. Legros y en años más recientes por Michael E. Fleet (Fleet, 2017; Legros, 1987).



La carbonatación de la OH-Ap, puede presentarse con diferentes sustituciones, sin embargo, el intercambio del ion carbonato en huesos ocurre en el canal OH^- de la hidroxiapatita, también referido como $z=0.5$, donde también se reporta un crecimiento sobre el eje axial c , sobre [001] (Fleet, 2004). La estructura cristalina de la hidroxiapatita carbonatada posee una estructura cristalina hexagonal, con grupo espacial P63/m. La estructura cristalina y los grupos espaciales de la hidroxiapatita carbonatada (OH(CO)₃-Ap) se mantiene con el mismo grupo espacial ante diferentes grados de carbonatación, véase Figura 4, donde se muestra la estructura de la OH(CO)₃-Ap, caso del a) sobre el eje a y el caso del b) sobre el eje c . En ella se muestra el crecimiento que tiene la carbonatación sobre el eje c , la cual corresponde a él ion OH en la hidroxiapatita sin carbonatar y sin crecimiento sobre el eje c . Los átomos de carbono, se encuentran en la superficie sobre el eje c y a su vez están enlazados a cuatro átomos de oxígeno. En la Figura 4 los átomos de oxígeno se representan en color rojo, los átomos de carbono, en color amarillo, los de calcio en color azul y los átomos de fósforo de color rosa.

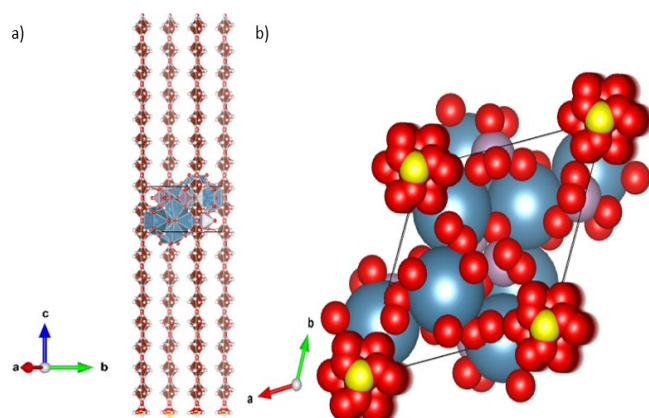


Figura 4: Estructura de la hidroxiapatita carbonatada. Modelado y editado en VESTA 2022.

2. Metodología

2.1. Obtención de las muestras óseas

Los huesos (fémures) usados en este trabajo, fueron extraídos de las ratas wistar sacrificadas y tratadas de acuerdo a lo establecido en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, correspondiente a técnicas experimentales (de analgesia y anestesia), administración de fluidos y sustancias,

así como métodos de eutanasia de animales empleados, así como especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio utilizados para la investigación científica.

En este estudio se utilizaron ratas machos y hembras con un peso promedio de 180 g. Las ratas se mantuvieron bajo condiciones estándar, ciclos de luz-oscuridad de 12 horas y a una temperatura de $22 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$. Se les proporcionó agua y alimento ad libitum. Los animales de experimentación fueron proporcionados por el Bioterio del Departamento de Medicina y Nutrición, de la División de Ciencias de la Salud, Campus León, de la Universidad de Guanajuato. A los especímenes de estudio se les indujo diabetes experimental mediante la administración de alloxana vía intraperitoneal con una dosis de 200 mg/Kg de peso corporal, para posteriormente registrar el peso y el nivel de glucosa semanalmente, para identificar los casos de ratas diabéticas que corresponderían aquellas que presentaron registro $\geq 200 \text{ mg/dL}$.

Posterior al sacrificio de las ratas, los fémures de cada rata fueron diseccionados, se eliminó el tejido por métodos mecánicos evitando al máximo dañar la superficie del hueso. Así mismo, se utilizaron escarabajos de la orden *Coleoptera* y de la familia *Dermestidae*, para realizar la limpieza exhaustiva los fémures de las ratas evitando utilizar algún tratamiento químico que promoviera cambios en la composición química del hueso. Una vez terminada la limpieza los fémures, se registró su peso, longitud total, epífisis superior e inferior, diáfisis y diámetro del cuello con la finalidad de control en el registro de las muestras.

2.2. Obtención de los patrones DRX experimentales

El análisis de la difracción de rayos-x de polvos (DRX), de las muestras del fémur se trituraron y pulverizaron tanto la cabeza como el cuello del fémur. Los patrones de DRX fueron obtenidos en un difractómetro Panalytical X'Pert PRO en un intervalo de 5 a 100 grados de 2θ con un avance de paso de 0.033 grados y 240 s/paso, utilizando la radiación $\text{CuK}\alpha$ como radiación de rayos-x incidente.

2.3. Refinamiento de los patrones DRX experimentales

Para conocer la estimación de las especies químicas y fases cristalinas en la bioapatita presente en las muestras óseas se aplica el método de Refinamiento Rietveld que lo emplea el software *Material Analysis Using Diffraction* (MAUD) que es de acceso libre (Lutterotti, 2003). Este método está basado en ajustar posibles estructuras teóricas (patrón DRX teórico) con los datos experimentales (patrón DRX experimental) mediante la técnica de mínimos cuadrados. Por lo tanto, se deben de tomar en cuenta un conjunto de criterios que son los indicadores que permiten valorar la calidad del avance en el proceso de refinamiento: criterio considerando como el factor teórico R_{wp} , el estadístico experimental R_{exp} , el factor de difracción R_B y el criterio de bondad χ (donde $\chi = R_{wp}/R_{exp}$) que el MAUD lo nombra R_b y Sig respectivamente.

3. Discusión de Resultados

3.1. Difractogramas Experimentales

Los patrones de difracción de rayos-x experimentales (20 a 60 de 2θ) de la bioapatita de este trabajo se muestran en la Figura 5 de esta sección, donde el difractograma de la muestra M-3 en verde color corresponde al caso no diabética con 50 mg/dL, las muestras M-7 (200 mg/dL) en azul y la M-9 (225 mg/dL) en gris son los casos de las ratas diabéticas. En la literatura científica se identifican las señales principales a las familias de planos (002), (211), (112) y (300) respectivamente, para la OH-Ap de estructura hexagonal mineral o biológica y se encuentra ampliamente utilizado el grupo espacial P63/m (Vandecandelaere, 2012).

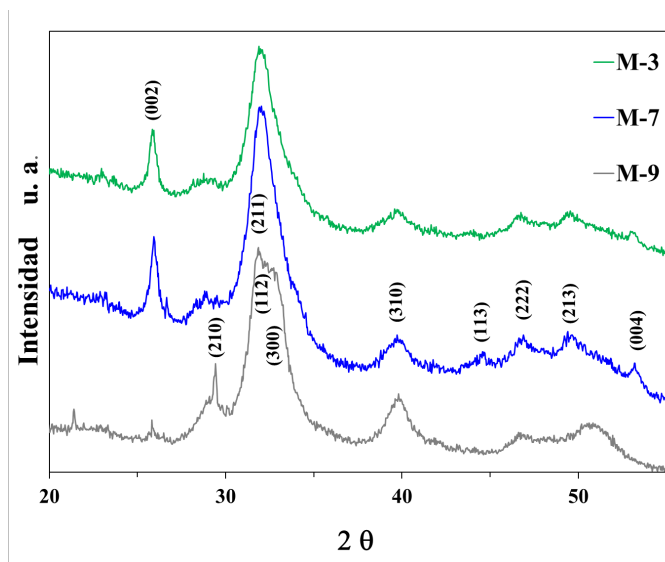


Figura 5: Patrones DRX experimentales de las muestras óseas.

3.1. Refinamiento Rietveld

Los refinamientos de las tres muestras de estudio, muestran un ajuste considerable de la línea base y las principales señales correspondientes de la OH-Ap señaladas en la literatura previa, véase Figura 5, haciendo énfasis en las señales ubicadas en ángulos de 25.8, 31.6, 32.5 y 33.0 de 2θ, los cuales son las correspondientes a las familias de planos (002), (211), (112) y (300) respectivamente y comparando con la literatura científica, se identifica la presencia de OH-Ap en todas las muestras.

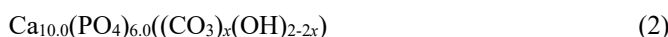
Los parámetros que se utilizan para la valoración de cada refinamiento se reportan en la Tabla 1, se identifica que los valores de Rwp y Rexp se encuentra dentro del intervalo que generalmente se consideran como buenos resultados que es entre el 10 a 20 %, además de identificar que el Rwp que se reporta con valores entre 2 a 0 % con lo cual se considera un buen refinamiento (Kniess, 2012).

El caso de la M-9 muestra un aumento en los valores de los indicadores hacia al límite superior indicado, en comparación a los obtenidos en las muestras M-3 y M-7, pero continúan siendo estos valores aceptables para ser considerado un buen refinamiento. Posiblemente este efecto pueda ser asignable a que el valor de Rexp aumento a las condiciones de la medición del patrón DRX experimental. Pero también en la muestra M-3 ocurre, sin embargo, el valor de Rwp no aumenta haciendo que el criterio de bondad Sig lo mantiene entre el valor de 1.0 a 1.3 que se considera de referencia aceptable.

Tabla 1: Parámetros numéricos del Refinamiento Rietveld de muestras óseas.

| Indice | M-3 | M-7 | M-9 |
|--------|------|------|------|
| Rwp | 3.68 | 3.40 | 9.56 |
| Rb | 2.90 | 2.53 | 6.50 |
| Rexp | 3.14 | 2.56 | 3.38 |
| Sig | 1.17 | 1.32 | 2.82 |

Los resultados cuantitativos de las fases de la OH-Ap se muestran en la Tabla 2. de esta manera se tiene certeza en los valores de porcentaje en peso mostrados. Para realizar el Refinamiento además de incluir el caso de la OH-Ap, se consideran otras especies con dos diferentes grados de carbonatación OHC22-Ap (C = 0.22) y OHC26-Ap (C = 0.26) (Fleet, 2004). Se incluyó en el refinamiento el patrón del colágeno y fosfatos de calcio ya que este último se presumía su existencia de acuerdo a análisis previo cualitativo mediante comparación con banco de datos cristalográficos de acceso libre, se considera el modelo de la sustitución del hidroxilo para el caso la carbonatación con la ecuación 2 (Pasteris, 2008; Yoder, 2016).



En la Tabla 2. se identifica una disminución notoria de la OH-Ap para el caso de M-9, las especies carbonatadas OHC22-Ap y OHC26-Ap, siendo esta última la fase más abundante, ambas fases muestran una clara tendencia de aumento de M-3 < M-7 < M-9, de acuerdo con el aumento de glucosa que presentaron al momento del sacrificio, se reporta que no hay presencia de fosfato de calcio en alguna de las muestras.

Tabla 2: Resultados cuantificación (%) másico mediante Refinamiento Rietveld de las muestras óseas.

| Especie | M-3 | M-7 | M-9 |
|--------------|-------|-------|-------|
| OH-Ap | 30.55 | 36.32 | 6.06 |
| OHC22-Ap | 0.87 | 0.99 | 1.80 |
| OHC26-Ap | 35.73 | 48.91 | 76.35 |
| Colageno C27 | 32.84 | 13.80 | 15.80 |
| Fosfato | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| OHC2T-AP | 36.60 | 49.90 | 78.15 |

4. Conclusiones

Los resultados obtenidos por DRX muestran asimetría considerable con respecto a la señal principal (211) mucho más evidente para el caso de la muestra M-9, que es el caso con los valores más altos de glucosa que fue la que presentó con mayor grado de glucosa en sangre al momento del sacrificio. Este efecto se atribuye al aumento en la intensidad de los planos (112) y (300).

La estimación cuantitativa realizada indica que las fases presentes en las bioapatitas reportadas indican la presunta relación directa de la sustitución de los grupos carbonatos en los sitios de fosfatos, identificando que la bioapatita para el caso no diabético (M-3) la OH-Ap está presente en una proporción muy similar que la OHC26-Ap, pero en el caso de

la M-9 la proporción de la OHC26-Ap es de 12:1 en relación a la OH-Ap.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Coordinación de Investigación del ITESI por el apoyo otorgado al proyecto interinstitucional: *Impacto de enfermedades crónico degenerativas en el sistema óseo*, para la promoción de la interacción entre cuerpos académicos reconocidos en PRODEP. A la M.V.Z. Cristina Araiza Martínez, responsable del Bioterio del Departamento de Medicina y Nutrición de la Universidad de Guanajuato *Campus León*. Al Centro de Investigación Materiales Avanzados (CIMAV) por la realización de los análisis de Difracción de Rayos-X.

Referencias

- Ardanova, L. I. (2010). Isomorphous Substitution of Rare Earth Elements for Calcium in Synthetic Hydroxyapatites. *Inorganic Chemistry*, 10687-100693.
- Fleet, M. E. (2017). Infrared spectra of carbonate apatites: Evidence for a connection between bone mineral and body fluids. *American Mineralogist*, 149-157.
- Fleet, M. E. (2004). Accommodation of the carbonate ion in apatite: An FTIR and X-Ray structure study of crystals synthesized at 2-4 GPa. *American Mineralogist*, 1433-2432.
- Gshalaev, V. S. (2012). *Hydroxyapatite: Synthesis, Properties and Applications*. New York: NOVA BIOMEDICAL.
- Kniess, C. T. (2012). The quantification of crystalline phases in materials: applications of rietveld method. *intech*.
- Legros, R. A. (1987). Age-Related Changes in Mineral of Rat and Bovine Cortical Bone. *Calcifiet Tissue International*, 137-144.
- Li, Z. A. (2014). Chemistry of bone mineral based on the hypermineralized rostrum of the beaked whale *Mesoplodon densirostris*. *American Mineralogist*, 645-653.
- Lutterotti L, (2003). Object oriented programming and fast computation techniques in MAUD, a program for powder diffraction analysis written in java. *IUCr: Compcomm Newsletter*, 1:43–50.
- Pasteris, J. D. J. (2008). Bone and Tooth Mineralization: Why Apatite?
- Setiawati, R. A. (2018). Bone Development and Growth. *IntechOpen*, 01-020.
- Tortora, G. J. (2004). *Principios de Anatomía y Fisiología*. México: Editorial Medica Panamericana.
- Vandecandelaere, N. A. (2012). Biomimetic apatite-based biomaterials: on the critical impact of synthesis and post-synthesis parameters. *Springer*, 2593-2606.
- Yoder, C. H. (2016). The relative stabilities of A- and B-type carbonate substitution in apatites synthesized in aqueous solution. *Mineralogical Magazine*, 977-983.